



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 040 799
A2

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: 81103849.6

⑤① Int. Cl.³: **C 12 N 9/74, C 12 N 9/96,**
C 12 Q 1/56

⑳ Anmeldetag: 19.05.81

③① Priorität: 22.05.80 DE 3019612

⑦① Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH,
Sandhofer Strasse 112-132 Postfach 31 01 20,
D-6800 Mannheim 31-Waldhof (DE)

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 02.12.81
Patentblatt 81/48

⑦② Erfinder: Lill, Helmut, Dr., Zugsplitzstrasse 24,
D-8121 Wielenbach (DE)
Erfinder: Bartl, Knut, Dr., Am Westend 6,
D-8121 Wilzhofen (DE)

④④ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE

⑦④ Vertreter: Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing Patentanwälte
Dipl.Ing.H.Weickmann et al, Dipl.Phys.Dr.K.Fincke
Dipl.Ing.F.A.Weickmann Dipl.Chem.B.Huber,
Dr.-Ing.H.Liska Möhlstrasse 22, D-8000 München 86 (DE)

⑤④ Stabilisiertes Thrombinpräparat.

⑤⑦ Ein stabilisiertes Thrombinpräparat in fester oder gelöster Form, insbesondere für analytische Zwecke, enthält als Stabilisatoren Serumalbumin in Kombination mit mindestens einem Proteasenhemmer, wie z.B. Aprotinin, und mindestens einem Chelatbildner.

EP 0 040 799 A2

- 1 -

Stabilisiertes Thrombinpräparat

Die Erfindung betrifft ein stabilisiertes Thrombinprä-
5 parat in fester oder gelöster Form, welches insbesondere für diagnostische Zwecke geeignet ist.

Thrombin (Blutgerinnungsfaktor IIa) spielt eine wichtige Rolle im Blutgerinnungssystem. Es wirkt einerseits
10 zurück auf das Prothrombin (Faktor II) im Sinne einer Regulation des Gerinnungsvorgangs, vor allem aber bewirkt es die Überführung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrinmonomer (FS) unter Peptidabspaltung, welches dann zum Fibrinpolymer gerinnen kann. Thrombin spielt daher
15 vor allem in der Diagnostik des Blutgerinnungssystems eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird es zur Bestimmung von Heparin oder von Antithrombin III verwendet.

20 Die Verwendung des Thrombins für Untersuchungen des Blutgerinnungssystems, insbesondere in Testsystemen, die für diesen Zweck bestimmt sind, wird durch die außerordentlich große Instabilität des Thrombins stark beeinträchtigt. Insbesondere in gelöster Form ist die
25 Instabilität sehr ausgeprägt. Beispielsweise ist eine wäßrige Thrombinlösung bei 0°C nur ca. 5 Stunden sta-

bil (Thromb. Diath. Hemorrh. 9, 169 (1963)). Für manche Präparate wird in gelöster Form bei 0°C eine Stabilität von nur 1 Stunde angegeben.

- 5 Abgesehen von dieser allgemeinen Instabilität von Thrombin wurde gefunden, daß gelegentlich außerordentlich rasch sehr starke Aktivitätsveränderungen im Sinne einer Inaktivierung bei Thrombin auftreten, die bei Verwendung im Rahmen analytischer Tests zu völlig un-
- 10 brauchbaren Resultaten führen. Versuche haben Anhaltspunkte dafür ergeben, daß diese Aktivitätsveränderung durch Behälteroberflächen bedingt ist, mit welchen die Thrombinlösung in Berührung kommt.
- 15 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, diese mit der Verwendung von Thrombin zusammenhängenden Schwierigkeiten zu beseitigen und ein stabilisiertes Thrombinpräparat zu entwickeln, welches sowohl in fester als auch in gelöster Form eine für praktische
- 20 Zwecke ausreichende Gebrauchsdauer aufweist und bei dem insbesondere auch unvorhersehbare zeitunabhängige Aktivitätsänderungen vermieden werden.
- 25 Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein stabilisiertes Thrombinpräparat in fester oder gelöster Form, insbesondere für analytische Zwecke, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Stabilisatoren Serumalbumin in Kombination mit mindestens einem Proteasehemmer und mindestens einem Chelatbildner enthält.
- 30 Die Erfindung beruht auf der Feststellung, daß die drei Komponenten des erfindungsgemäßen Mittels eine synergistische Wirksamkeit ausüben, die zu einem sehr stabilen Thrombinpräparat führt, bei welchem auch die bisher beobachteten Ausreißer im Sinne einer plötzlichen Aktivi-
- 35

tätsabnahme nicht auftreten. So weist ein erfindungsgemäß stabilisiertes Thrombinpräparat in Form einer wäßrigen Lösung bei einmonatiger Lagerung bei 33°C noch eine Aktivität von etwa 80 % des Ausgangswerts auf. Wird eine wäßrige Lösung des erfindungsgemäßen Präparats in üblicher Weise bei etwa 0°C gelagert, so weist sie viele Monate lang eine nur unwesentlich veränderte Aktivität auf.

- 10 Vorzugsweise enthält das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombinpräparat Chelatbildner in einer Menge zwischen 0,01 und 0,2 M, Proteasenhemmer in einer Menge von 1 bis 100 µg/ml und Serumalbumin in einer Menge von 5 bis 100 mg/ml bzw., soweit es sich um ein Trockenpräparat
- 15 handelt, in einer Menge, die bei Auflösen in der vorgesehenen Lösungsmittelmenge derartige Konzentrationen ergibt.

Unter den Chelatbildnern werden die sechszähligen Liganden bevorzugt. Beispiele hierfür sind Nitrilotriessigsäure, Cyclohexylen-(1,2)-dinitrilotetraessigsäure, Diäthylentriamin-pentaessigsäure und Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA). Bevorzugt wird EDTA. Die besten Ergebnisse werden erhalten, wenn der Chelatbildner in

25 einer Konzentration von 0,03 bis 0,1 M vorliegt.

Als Proteasenhemmer kommen im erfindungsgemäßen, stabilisierten Thrombinpräparat solche in Betracht, die Thrombin selbst nicht hemmen. Beispiele hierfür sind

30 Aprotinin und Sojabohnen-trypsininhibitor (STi). Weitere geeignete Proteaseinhibitoren finden sich in "The Enzymes", Vol. III, 3. Auflage 1971, S. 380-382 angegeben. Bevorzugt wird Aprotinin verwendet, da es als Handelspräparat leicht zugänglich ist.

Die dritte Komponente des im erfindungsgemäßen Thrombinpräparat enthaltenen Stabilisierungsmittels ist Serumalbumin. Das Serumalbumin kann beliebiger Herkunft sein, bevorzugt wird jedoch Rinderserumalbumin (RSA) aufgrund
5 seiner leichten Zugänglichkeit. Wie bereits erwähnt, sollte die Lösung 0,5 bis 10 %, vorzugsweise 1 bis 5 % (10 bis 50 mg/ml) enthalten. Nach den vorliegenden Resultaten scheint vor allem das Serumalbumin den plötzlichen Aktivitätsabfall von Thrombin zu verhindern. Es
10 wird vermutet, daß der erwähnte Aktivitätsabfall durch Detergentienspuren, insbesondere durch anionische Detergentienspuren, die bei der Reinigung von Geräten und Gefäßen, mit denen die Thrombinlösung in Berührung kommt, zurückgeblieben sind, verursacht werden.

15 Das erfindungsgemäße, stabilisierte Thrombinpräparat kann als solches oder im Gemisch mit anderen Substanzen in Form eines kombinierten Reagensgemisches vorliegen. Wenn es in gelöster Form vorliegt, so soll ein etwa neutraler pH-Wert (6,0 bis 8,0, vorzugsweise 6,5 bis 7,5)
20 vorliegen. In den meisten Fällen reicht die Pufferkapazität des Chelatbildners aus, um diesen pH-Bereich einzustellen. Jedoch kann auch eine übliche Puffersubstanz zugesetzt werden. Auch das Trockenpräparat, welches im
25 allgemeinen in lyophilisierter Form vorliegt, kann eine solche Puffersubstanz bereits enthalten.

Bei handelsüblichen Thrombinpräparaten nimmt im Durchschnitt die Aktivität bei Lagerung in wässriger Lösung
30 bei Raumtemperatur in zwei Wochen um etwa 50 % ab. Unter den gleichen Bedingungen tritt beim erfindungsgemäß stabilisierten Präparat im Rahmen der Fehlergrenze keine Aktivitätsabnahme auf.

35 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

117 mg eines stabilisierten Thrombin-Lyophilisats der Zusammensetzung:

- 5 47,9 % EDTA, 51,28 % RSA, 0,02 % Aprotinin, 0,5 % Natriumazid (als Konservierungsmittel), 0,3 % Thrombin werden mit 3 ml bidestilliertem Wasser gelöst und die Stabilität der Lösung untersucht.
- 10 Stabilität der Thrombinlösung:

		Thrombinaktivität (pH 8,1; 25°C; TOS-Gly-Pro-Arg-pNa als Substrat)		
		Ausgangs-Wert (U/ml)	1 Woche (U/ml)	2 Wochen (U/ml)
15	Lyophilisat bei +4°C gelagert. Lösung bei + 4°C gelagert	0,46	0,46	0,48
	Lyophilisat bei +4°C gelagert. Lösung bei Raumtemperatur gelagert	0,47	0,46	0,48
	Lyophilisat 3 Wochen bei 35°C gelagert. Lösung bei +4°C gelagert	0,46	0,46	0,47
20	Lyophilisat 3 Wochen bei 35°C gelagert. Lösung bei Raumtemperatur gelagert	0,47	0,46	0,47

Beispiel 2

- 25 Die stabilisierende Wirksamkeit des erfindungsgemäßen stabilisierten Thrombinpräparats wurde verglichen mit der stabilisierenden Wirksamkeit der Einzelkomponenten und der verschiedenen möglichen Kombinationen von jeweils zwei der drei erfindungsgemäß vorhandenen Komponenten.
- 30

In der nachstehenden Tabelle wird die Abnahme der Thrombinaktivität in Prozent bei den verschiedenen stabilisierten Thrombinpräparaten angegeben. Die EDTA-Menge betrug 50 mM, pH 6,9; die Aprotininmenge betrug 1 mg/100 ml, die RSA-Menge 2 g/100 ml.

TABELLE

Einfluß von EDTA, Aprotinin und Serumalbumin auf die
10 Thrombin-Stabilität

	Lagerung bei 35°C (Wochen)	bid. Wasser	RSA	Aproti- nin	Aproti- nin RSA	EDTA	EDTA Apro- tinin	EDTA RSA	EDTA Apro- tinin RSA
15	1	87,5	85,7	65,8	82,2	17,0	10,6	10,0	8,3
	2	98,0	98,0	89,5	95,6	31,9	12,8	12,0	10,4

Aus den obigen Werten ergibt sich, daß Serumalbumin kei-
20 nen und der Proteasenhemmer nur einen sehr geringen sta-
bilisierenden Einfluß ausüben und die Kombination Serum-
albumin/Proteasenhemmer ebenfalls überhaupt nicht sta-
bilisiert. Der Chelatbildner stabilisiert zwar, jedoch
25 wird durch Zusatz der für sich allein völlig unwirksa-
men Mischung von Serumalbumin und Proteasenhemmer eine
weitaus überlegene Stabilisierungswirkung erzielt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Stabilisiertes Thrombinpräparat in fester oder
5 gelöster Form, insbesondere für analytische Zwecke, da-
durch g e k e n n z e i c h n e t , daß es als Stabi-
lisatoren Serumalbumin in Kombination mit mindestens
einem Proteasenhemmer und mindestens einem Chelatbild-
ner enthält.
- 10 2. Stabilisiertes Thrombinpräparat nach Anspruch 1,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß es
0,01 bis 0,2 M Chelatbildner,
1 bis 100 µg/ml Proteasenhemmer und
15 5 bis 100 mg/ml Serumalbumin
enthält.
3. Stabilisiertes Thrombinpräparat nach Anspruch 1
oder 2, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß es
20 als Chelatbildner einen sechszähnigen Liganden enthält.
4. Stabilisiertes Thrombinpräparat nach Anspruch 3,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß es als sechs-
zähnigen Liganden Äthylendiamintetraessigsäure enthält.
- 25 5. Stabilisiertes Thrombinpräparat nach einem der
vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß es als Proteasenhemmer Aprotinin
enthält.
- 30 6. Stabilisiertes Thrombinpräparat nach einem der
vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß es
0,03 bis 0,1 M Äthylendiamintetraessigsäure,
35 5 bis 20 µg/ml Aprotinin und

10 bis 40 mg/ml Serumalbumin
enthält.